

University of Groningen

Novel molecular targets in hepatic stellate cells for the treatment of liver fibrosis

Smith Cortínez, Natalia

DOI:
[10.33612/diss.128130988](https://doi.org/10.33612/diss.128130988)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Smith Cortínez, N. (2020). *Novel molecular targets in hepatic stellate cells for the treatment of liver fibrosis*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.
<https://doi.org/10.33612/diss.128130988>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.



Chapter 7.

ENGLISH SUMMARY, NEDERLANDSE
SAMENVATTING AND RESUMEN EN ESPAÑOL

I. English Abstract

Liver fibrosis is the result of chronic liver diseases that lead to cell death and scarring due to extracellular matrix (ECM) deposition. Hepatic stellate cells (HSC) are myofibroblast-like cells that activate upon injury and produce ECM. If the cause of damage is not halted, liver fibrosis progresses to cirrhosis, which is an end-stage disease, and patients might develop life-threatening complications, such as portal hypertension and liver failure and are at increased risk for developing hepatocellular carcinoma. Although there is already considerable knowledge about the molecular mechanisms driving the HSC activation process leading to liver fibrosis, there is currently no cure for liver fibrosis and liver transplantation is the only therapeutic option for end-stage cirrhotic patients.

HSC activation, from quiescent HSC (qHSC) to activated HSC (aHSC) is controlled by the pro-fibrogenic cytokine transforming growth factor-beta (TGF β) and regulates the production of alpha-smooth muscle actin (α SMA) and collagen-I, key markers of aHSC. aHSC produce the ECM components that drive the progression of liver fibrosis, so finding novel drugs that prevent or reverse the activation of HSC is an important step in developing effective treatments for liver fibrosis. In order to find novel targets to prevent liver fibrosis progression we undertook two approaches. As mentioned previously, HSC activation is the process by which qHSC become fibrogenic, and so, in **Chapter 2** and **Chapter 3**, we targeted metabolic pathways that are involved in HSC activation. Excessive ECM deposition is the process that ultimately causes the scarring of the liver, e.g. fibrosis that may progress to cirrhosis, and it is mediated by aHSC. Thus, in **Chapter 4** and **Chapter 5**, we investigated the molecular mechanisms driving collagen-I, the most prominent ECM component in fibrosis, export and targeted key proteins in this pathway to find novel targets to treat liver fibrosis. For a graphical summary please see Figure 1.

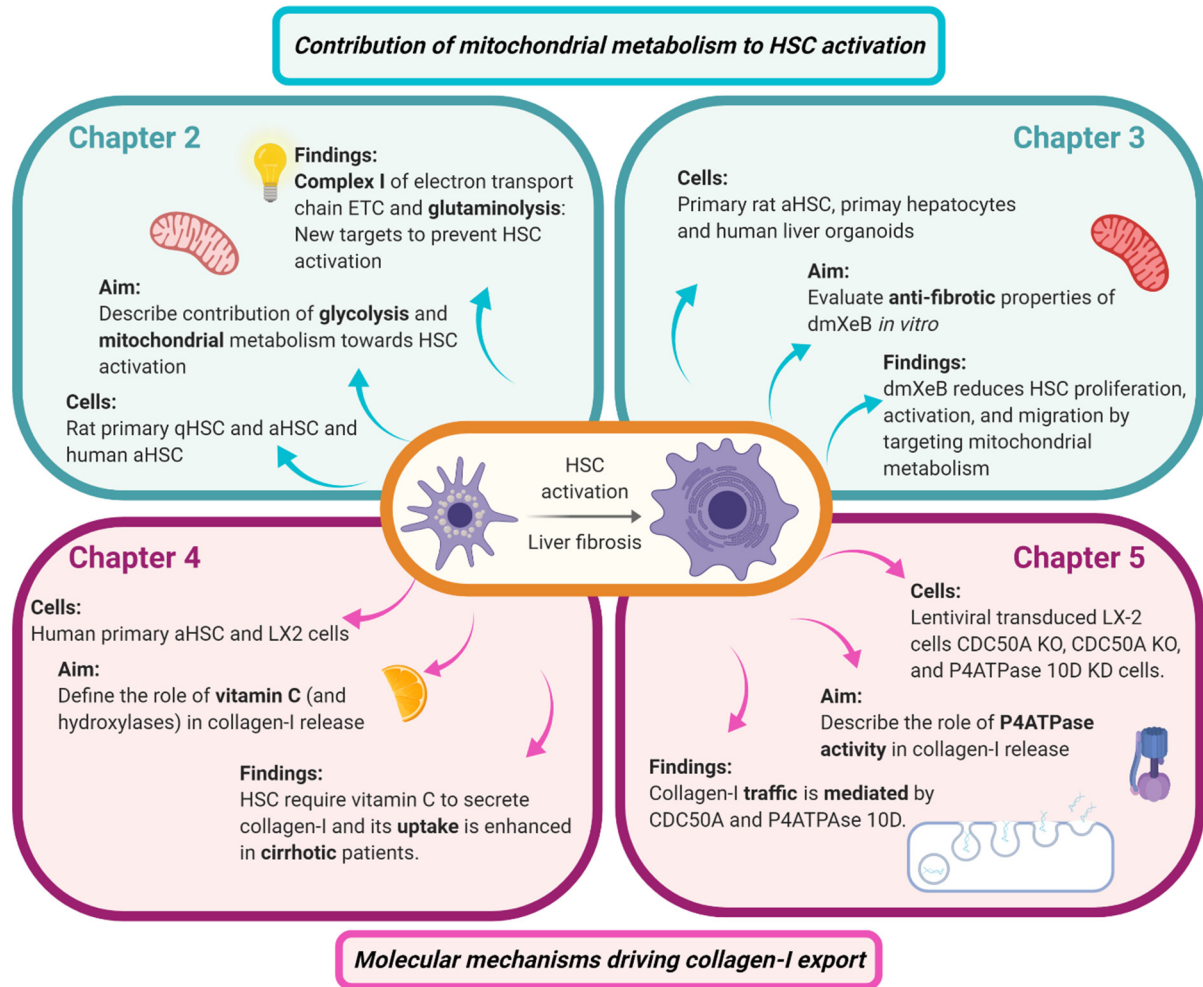


Figure 1: Graphical summary of main results obtained in this thesis. The main objective of this thesis was to discover novel molecular targets to treat liver fibrosis by preventing -or reversing- HSC activation *in vitro*. For this, we investigated two main mechanisms: 1. mitochondrial – and glycolytic metabolism and its contribution to HSC activation (Chapter 2 and Chapter 3), and 2. Collagen release by HSC (Chapter 4 and chapter 5). In the figure, we have summarized the model we used, the general aim and the main findings on each experimental chapter. Figure created with BioRender.com.

HSC activation is associated with increased glycolysis and glutaminolysis, and the functional contribution of mitochondrial and glycolytic metabolism was evaluated in **Chapter 2**. This was done by measuring mitochondrial and glycolytic metabolism in primary rat qHSC and aHSC, simultaneously, using an extracellular flux analyzer. We showed that the activation of HSC is driven by the simultaneous induction of glycolysis and mitochondrial metabolism. Furthermore, we determined the effect of targeting mitochondrial and glycolytic metabolism in HSC activation. For this, we treated primary rat and primary human aHSC with a glycolysis inhibitor (2-Deoxy-D-glucose), a

glutaminolysis inhibitor (CB-839) or an inhibitor of complex I of the mitochondrial electron transport chain (rotenone for rat aHSC and metformin for human aHSC) and analyzed mRNA and protein levels of activation markers (α SMA, Collagen-I). Inhibition of glycolysis and glutaminolysis did not inhibit rat aHSC proliferation, but slightly reduced α SMA mRNA expression. In contrast, inhibiting mitochondrial complex I (by rotenone) significantly suppressed rat aHSC proliferation, as well as collagen-I and α SMA mRNA expression. Other than observed for rat aHSC, human aHSC proliferation and expression of fibrosis markers were significantly suppressed by inhibiting either glycolysis, glutaminolysis or mitochondrial complex I (by metformin). Overall, we conclude that targeting HSC metabolism is an interesting and relevant strategy to suppress hepatic fibrogenesis.

It is well-known that intracellular calcium fluxes control activation, migration and proliferation of HSC and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP₃R) is a transporter that controls calcium fluxes out of the endoplasmic reticulum (ER). In **Chapter 3**, we investigated the role of a novel IP₃R inhibitor, desmethyl Xestospongine B (dmXeB), to modulate HSC activation. For this, we used primary rat qHSC and aHSC and analyzed mRNA and protein levels of activation markers (α SMA, Collagen-I), proliferation, migration, and glycolytic and mitochondrial metabolism in the absence or presence of dmXeB. DmXeB suppressed proliferation, migration, activation markers and mitochondrial respiration in fully activated rat HSC. Moreover, it preserved qHSC characteristics in culture. Importantly, dmXeB was not toxic for primary rat hepatocytes nor for human liver organoids. This suggests that dmXeB could be a potential candidate drug for the treatment of liver fibrosis.

As mentioned previously, the fibrotic ECM is mainly composed of collagens and aHSC are the main cell type responsible for collagen production and secretion. Vitamin C (ascorbic acid) is a cofactor of prolyl-hydroxylases that participate in the synthesis and secretion of collagens, but this has not been analyzed in detail yet for human aHSC. Thus, we determined the effect of ascorbic acid and prolyl-hydroxylase inhibition on collagen production and secretion by HSC. Primary human HSC (p-hHSC) were isolated from healthy liver tissue and culture-activated. p-hHSC and the human HSC cell line LX-2 were treated with ascorbic acid, transforming growth factor beta (TGF β) and/or the pan-hydroxylase inhibitor dimethyloxalylglycine (DMOG). Ascorbic acid in co-treatment with TGF β strongly promoted collagen-I release, causing a strong reduction in intracellular collagen-I protein levels and enhancing hydroxyproline

release to the extracellular space. DMOG efficiently inhibited collagen-I release even in the presence of ascorbic acid and suppressed mRNA levels of collagen-I and α SMA, also under hypoxic conditions. Furthermore, p-hHSC and LX-2 express only one of the two ascorbic acid transporters and this was selectively enhanced in cirrhotic livers. Overall, we conclude that human HSC need ascorbic acid for efficient collagen-I secretion, which can be effectively blocked by hydroxylase antagonists, revealing new therapeutic targets for the treatment of liver fibrosis.

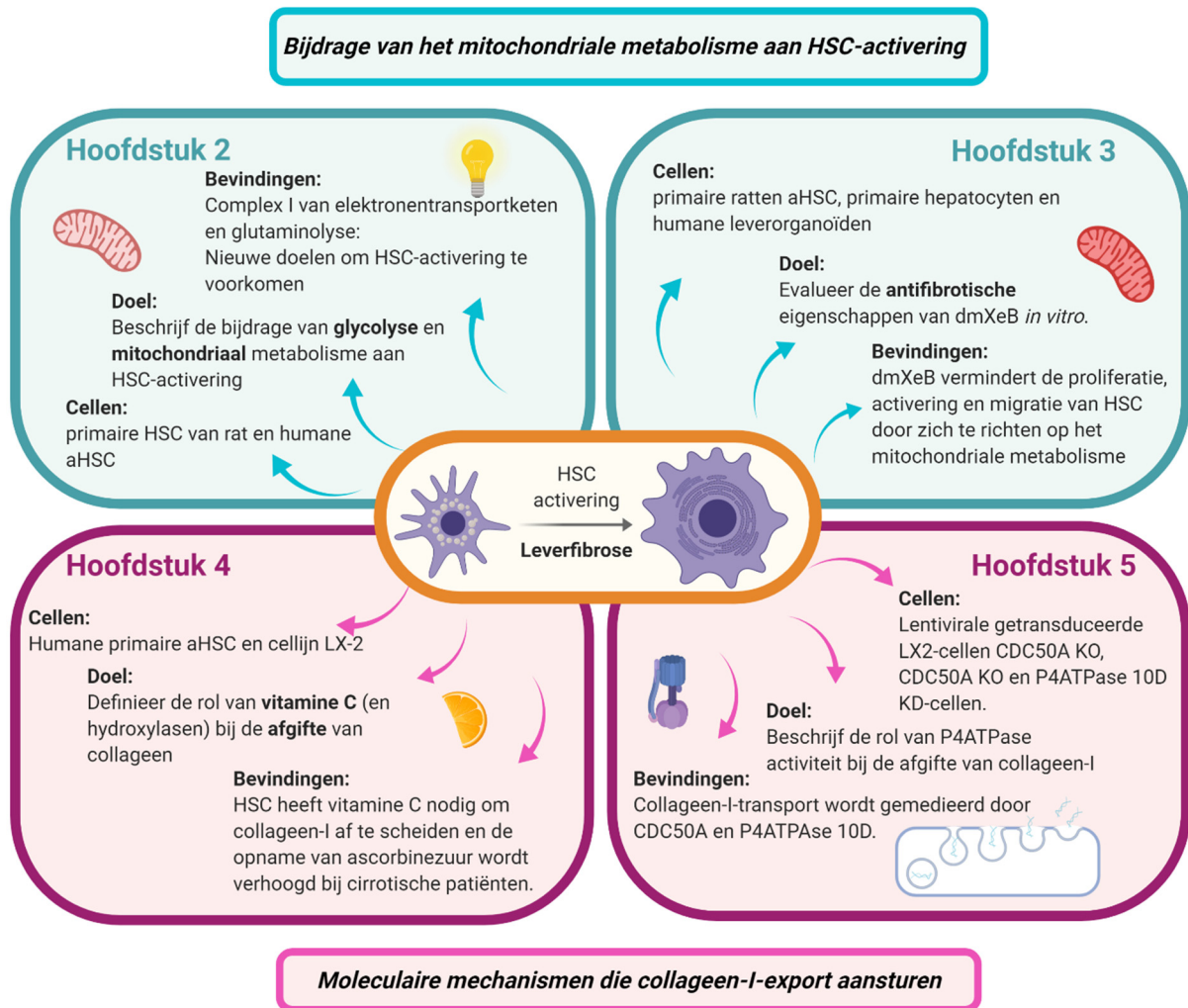
The molecular machinery driving collagen-I export from ER to the extracellular space is actually poorly understood, and in **Chapter 5** we evaluated the role of Class 4 P-type ATPases (P4-ATPases), which regulate lipid asymmetry in biological membranes and control vesicle-mediated secretion of proteins. Here, we analyzed the role of CDC50A (an essential partner of most P4-ATPases) and various P4-ATPases in controlling collagen secretion by human HSC. Lentiviral shRNA interference (gene knock-down) and CRISPR-Cas9 (gene knock-out) was used to impair *CDCA50A* and *P4-ATPase* gene function in LX-2 cells. Reducing CDC50A and ATP10D in LX2 cells caused a clear intracellular collagen-I accumulation and reduced extracellular deposition. Heterologously-expressed CDC50A-HA colocalized with intracellular collagen-I and suppressed its intracellular accumulation. Our results demonstrate that ATP10D and its accessory partner CDC50A are required for efficient secretion of collagen-I by human hepatic stellate cells and therefore play a role in the development of liver fibrosis.

To summarize, by describing key metabolic pathways in HSC and the molecular mechanisms driving collagen-I production and release by HSC *in vitro*, we identified novel targets for the treatment of liver fibrosis. Future investigations should focus on translating these findings to patient care.

II. Nederlandse Samenvatting

Leverfibrose is het resultaat van chronische leveraandoeningen die leiden tot verlies van functioneel leverweefsel en vorming van littekenweefsel als gevolg van afzetting van extracellulaire matrix (ECM), vooral collagenen. Lever (hepatische) stellaatcellen (HSC) zijn myofibroblast-achtige cellen die bij leverschade worden geactiveerd en produceren de ECM. Als de oorzaak van de leverziekte niet wordt weggenomen, ontwikkelt leverfibrose zich tot cirrose wat het eindstadium van de ziekte is. Patiënten kunnen dan levensbedreigende complicaties ontwikkelen, zoals portale hypertensie en leverfalen, en ze lopen een verhoogd risico op het ontwikkelen van leverkanker. Hoewel er al veel kennis is over de moleculaire mechanismen die HSC activeren, is er op dit moment nog geen effectieve behandeling voor leverfibrose en is levertransplantatie de enige therapeutische optie voor patiënten in het eindstadium van cirrose.

Activatie van “rustende” HSC (qHSC) tot geactiveerde HSC (aHSC) wordt gecontroleerd door het pro-fibrogene cytokine transforming growth factor- β (TGF β). Het reguleert de productie van collagenen en alfa-smooth muscle actin (α SMA), twee kenmerken van de aHSC. De aHSC produceren de ECM-componenten die leiden tot de progressie van leverfibrose, dus nieuwe geneesmiddelen die de activering van HSC voorkomen of omkeren is een belangrijke stap in het ontwikkelen van effectieve behandelingen voor leverfibrose. Om deze nieuwe “anti-fibrotische” geneesmiddelen te vinden, hebben we twee benaderingen gevolgd. In **hoofdstuk 2** en **hoofdstuk 3** richtten we ons op de metabole processen die betrokken zijn bij HSC-activatie. Overmatige ECM-afzetting is het proces dat uiteindelijk de vorming van littekenweefsel in de lever veroorzaakt, waarbij fibrose kan verergeren tot cirrose, en wordt veroorzaakt door aHSC. Daarom hebben we in **hoofdstuk 4** en **hoofdstuk 5** de moleculaire mechanismen onderzocht die de productie en export van collageen-I aansturen, het meest prominente component van littekenweefsel in fibrose, om daarmee nieuwe methoden te vinden voor de behandeling van leverfibrose. Zie figuur 2 voor een grafische samenvatting van het werk gepresenteerd in dit proefschrift.



Figuur 2: Grafische samenvatting van de belangrijkste resultaten verkregen in dit proefschrift. Het hoofddoel van dit proefschrift was het ontdekken van nieuwe moleculaire doelwitten voor de behandeling van leverfibrose door het voorkomen of omkeren van HSC-activering *in vitro*. Hiervoor hebben we twee hoofdmechanismen onderzocht: 1. mitochondriaal - en glycolytisch metabolisme en zijn bijdrage aan HSC-activering (hoofdstuk 2 en hoofdstuk 3), en 2. Collageen productie en transport door HSC (hoofdstuk 4 en hoofdstuk 5). In het figuur hebben we het model dat we hebben gebruikt, het algemene doel en de belangrijkste bevindingen van elk experimenteel hoofdstuk samengevat. Figuur gemaakt met BioRender.com.

HSC-activatie wordt geassocieerd met verhoogde glycolyse en glutaminolyse. De functionele bijdrage van het mitochondriaal en glycolytisch metabolisme werd bestudeerd in **hoofdstuk 2**. Hiervoor werd het mitochondriaal en glycolytisch metabolisme in primaire rat qHSC en aHSC gelijktijdig gemeten met behulp van een extracellulaire fluxanalysator. We toonden aan dat de activatie van HSC wordt aangestuurd door gelijktijdige inductie van zowel glycolyse als mitochondriaal metabolisme. Vooral dat laatste is een nieuwe bevinding. Om het effect op de HSC

activatie verder te onderzoeken hebben we de mitochondriaal en glycolytisch metabolismen gemanipuleerd. Hiervoor hebben we primaire rat en primaire humane aHSC behandeld met een glycolyseremmer (2-deoxy-D-glucose), een glutaminolyse-remmer (CB-839) of een remmer van complex I van de mitochondriale elektronentransportketen (rotenon voor rat-aHSC en metformine voor humaan aHSC) en werden mRNA en eiwitniveaus van activeringsmarkers (α SMA, Collageen-I) geanalyseerd. Remming van glycolyse en glutaminolyse remde de rat aHSC-proliferatie niet, maar verminderde α SMA mRNA expressie enigszins. Daarentegen werd door het remmen van mitochondriaal complex I (door rotenon) de rat aHSC-proliferatie en collageen-I en α SMA mRNA expressie significant verlaagd. Anders dan waargenomen voor de aHSC van ratten, werden de proliferatie van humane aHSC en expressie van fibrose-markers significant verminderd door zowel glycolyse, glutaminolyse of mitochondriaal complex I (door metformine) te remmen. Al met al concluderen we dat het doelgericht remmen van het HSC-metabolisme een interessante en relevante strategie is om leverfibrose te onderdrukken.

Het is bekend dat intracellulaire calciumfluxen de activering, migratie en proliferatie van HSC regelen en de inositol 1,4,5-trisfosfaatreceptor (IP3R) is een transporter die calciumfluxen uit het endoplasmatisch reticulum (ER) reguleert. In **hoofdstuk 3** hebben we de rol van een nieuwe IP3R-remmer, desmethyl Xestospongin B (dmXeB), onderzocht om HSC-activatie te moduleren. Hiervoor gebruikten we primaire qHSC en aHSC van ratten en analyseerden mRNA en eiwitniveaus van activeringsmarkers (α SMA, Collageen-I), proliferatie, migratie en glycolytisch en mitochondriaal metabolisme in afwezigheid of aanwezigheid van dmXeB. DmXeB onderdrukte proliferatie, migratie, activeringsmarkers en mitochondriale metabolisme in volledig geactiveerde HSC van ratten. Bovendien behielden de cellen de kenmerken van qHSC tijdens het kweken. Ook belangrijk is dat dmXeB niet giftig was voor primaire hepatocyten van ratten, noch voor menselijke lever organoïden. Dit suggereert dat dmXeB een mogelijk kandidaat-medicijn zou kunnen zijn voor de behandeling van leverfibrose.

Zoals eerder vermeld, bestaat de fibrotische ECM voornamelijk uit collagenen en is de aHSC het belangrijkste celtype dat verantwoordelijk is voor de productie en secretie van collageen. Vitamine C (ascorbinezuur) is een cofactor van prolyl-hydroxylases die bijdragen aan de synthese en uitscheiding van collagenen. Dit is

echter nog niet in detail geanalyseerd voor humane aHSC. Daarom hebben we in **hoofdstuk 4** het effect van ascorbinezuur en de remming van prolyl-hydroxylases bepaald op de productie en uitscheiding van collageen door HSC. Primaire humane HSC (p-hHSC) werden geïsoleerd uit gezond leverweefsel en door kweken geactiveerd. p-hHSC en de humane HSC-celijn LX-2 werden behandeld met ascorbinezuur, de groeifactor TGF β en/of de pan-hydroxylase-remmer dimethyloxallylglycine (DMOG). De behandeling met ascorbinezuur samen met TGF β stimuleerde de afgifte van collageen-I sterk, wat een sterke verlaging van de intracellulaire collageen-I-eiwitniveaus veroorzaakte en de afgifte van hydroxyproline aan de extracellulaire ruimte verbeterde. DMOG remde efficiënt de afgifte van collageen-I, zelfs in de aanwezigheid van ascorbinezuur en onderdrukte de mRNA niveaus van collageen-I en α SMA, ook onder omstandigheden met lage zuurstof spanning (hypoxie). Bovendien komt in p-hHSC en LX-2 cellen slechts één van de twee ascorbinezuurtransporters tot expressie en de expressie werd selectief verhoogd bij cirrotische levers. Algemeen kunnen we concluderen dat de humane HSC ascorbinezuur nodig hebben voor efficiënte collageen-I-secretie. Vervolgens kan dit effectief worden geblokkeerd door hydroxylase-antagonisten, waardoor nieuwe therapeutische mogelijkheden ontstaan voor de behandeling van leverfibrose.

De moleculaire mechanismen die de export van collageen-I van ER naar de extracellulaire ruimte aansturen zijn nog maar weinig bekend. In **hoofdstuk 5** hebben we bestudeerd welke rol klasse 4 P-type ATPases (P4-ATPases) hierin hebben. Deze ATPases reguleren de asymmetrie van lipiden in biologische membranen en controleren de secretie van eiwitten. We analyseerden de rol van CDC50A (een essentiële partner van de meeste P4-ATPases) en verschillende P4-ATPases bij het reguleren van de secretie van collageen door humane HSC. Lentivirale shRNA-interferentie (gen knock-down) en CRISPR-Cas9 (gen knock-out) werden gebruikt om de CDC50A- en P4-ATPase-genfunctie in LX-2-cellen af te zwakken. Het verminderen van CDC50A en ATP10D in LX2-cellen veroorzaakte een duidelijke intracellulaire ophoping van collageen-I en verminderde de extracellulaire uitscheiding. Heterologe expressie van CDC50A-HA co-localiseerde met intracellulair collageen-I en onderdrukte de intracellulaire accumulatie ervan. Onze resultaten tonen aan dat ATP10D en zijn partner CDC50A nodig zijn voor een efficiënte secretie van collageen-

I door de humane stellaatcellen in de lever en spelen daarom dus een rol bij de ontwikkeling van leverfibrose.

Samenvattend, door het beschrijven van belangrijke metabole routes in HSC en de moleculaire mechanismen die de productie van collageen-I en afgifte door HSC in vitro aansturen, identificeerden we nieuwe mogelijkheden voor de behandeling van leverfibrose. Toekomstig onderzoek zou zich moeten concentreren op het vertalen van deze bevindingen naar patiëntenzorg.

III. Resumen en Español

La fibrosis hepática es el resultado de enfermedades hepáticas crónicas que conducen a la muerte celular y la cicatrización debido a la deposición de proteínas de matriz extracelular (MEC). Las células estrelladas hepáticas (HSC) son células similares a los miofibroblastos que se activan después de una lesión y producen proteínas de MEC. Si no se detiene la causa del daño, la fibrosis hepática progresa a cirrosis, que es una enfermedad terminal, y los pacientes pueden desarrollar complicaciones potencialmente mortales, como hipertensión portal y falla hepática, y tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de hígado. Aunque existen evidencias considerable sobre los mecanismos moleculares que impulsan el proceso de activación de HSC, actualmente no existe una cura para la fibrosis hepática y el trasplante de hígado es la única opción terapéutica para pacientes cirróticos en etapa terminal.

La activación de HSC, desde HSC quiescente (qHSC) hasta HSC activada (aHSC) está controlada por citoquinas pro-fibrogénicas como el factor de crecimiento transformante beta ($TGF\beta$) y regula la producción de actina del músculo liso alfa (α SMA) y colágeno-I, claves marcadores de aHSC. Las aHSC producen los componentes de ECM que impulsan la progresión de la fibrosis hepática, por lo que encontrar nuevos blancos terapéuticos que prevengan o reviertan la activación de HSC es un paso importante en el desarrollo de tratamientos efectivos para estos pacientes. Con el fin de encontrar nuevos blancos para prevenir la progresión de la fibrosis hepática, nos enfocamos en dos frentes. Como fue mencionado anteriormente, la activación de HSC es el proceso por el cual las qHSC se vuelven fibrogénicas: en el **Capítulo 2** y **Capítulo 3**, investigamos las vías metabólicas involucradas en la activación de HSC. Además, el depósito excesivo de proteínas de ECM es el proceso que gatilla la cicatrización del hígado, y está mediada por aHSC. Por lo tanto, en el **Capítulo 4** y **Capítulo 5**, investigamos los mecanismos moleculares que impulsan la secreción de colágeno-I, la proteína más abundante en el hígado fibrótico, y silenciemos proteínas clave en esta vía para encontrar nuevos blancos terapéuticos para tratar la fibrosis hepática. Para un resumen gráfico, consulte la **Figura 3**.

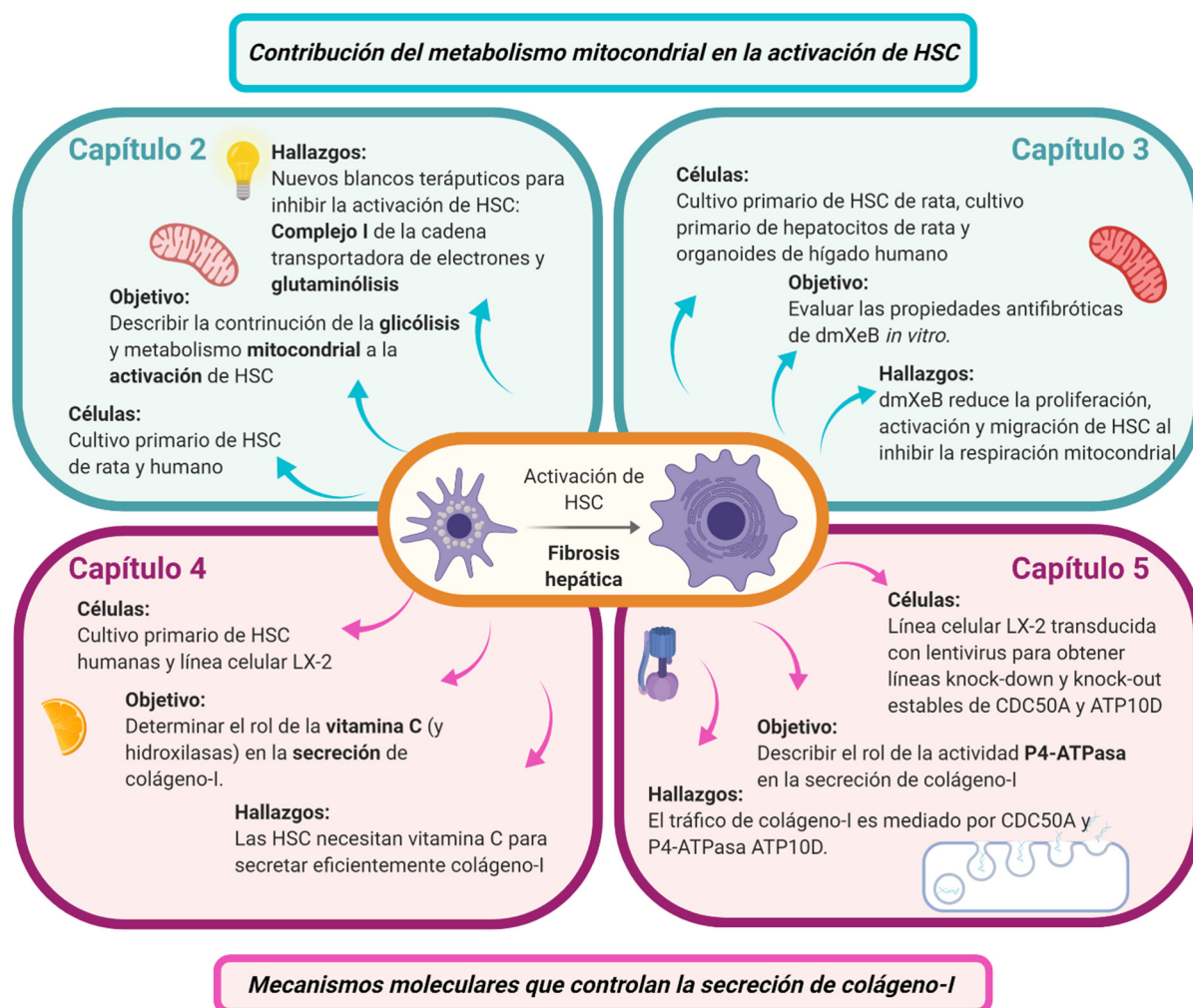


Figura 3: Resumen gráfico de los principales resultados obtenidos en esta tesis. El objetivo principal de esta tesis fue descubrir nuevos blancos moleculares para tratar la fibrosis hepática evitando -o revertiendo- la activación del HSC *in vitro*. Para esto, investigamos dos mecanismos principales: 1. metabolismo mitocondrial y glucolítico y su contribución a la activación de HSC (Capítulo 2 y Capítulo 3), y 2. Liberación de colágeno-I por HSC (Capítulo 4 y capítulo 5). En la figura, hemos resumido los modelos utilizados, el objetivo general y los principales hallazgos en cada capítulo experimental. Figura creada con BioRender.com.

La activación de HSC se asocia con un aumento de la glucólisis y glutaminólisis. En el capítulo 2 evaluamos la contribución del metabolismo mitocondrial y glucolítico en este proceso. Esto fue realizado midiendo simultáneamente el ambos tipos de metabolismo en cultivos primario de qHSC y aHSC de rata, utilizando un analizador de flujo metabólico extracelular. Demostramos que la activación de HSC es impulsada por la inducción de glucólisis y metabolismo mitocondrial. Además, determinamos el efecto de inhibir el metabolismo mitocondrial y glucolítico en la activación de HSC. Para esto, tratamos células aHSC primarias de rata y humano con un inhibidor de la

glucólisis (2-deoxi-D-glucosa), un inhibidor de la glutaminólisis (CB-839) o un inhibidor del complejo I de la cadena transportadora de electrones (rotenona para aHSC de rata y metformina para aHSC de humano) y analizamos los niveles de mRNA y proteínas de los marcadores de activación (α SMA y colágeno-I). La inhibición de la glucólisis y glutaminólisis no afectó la proliferación de aHSC de rata, pero redujo ligeramente la expresión de α SMA. Por el contrario, la inhibición del complejo I de la mitocondria suprimió significativamente la proliferación de aHSC de rata, así como la expresión de mRNA de colágeno-I y α SMA. Aún más, la proliferación de aHSC humanas y la expresión de marcadores de fibrosis se suprimieron significativamente inhibiendo la glucólisis, glutaminólisis o el complejo I mitocondrial (por metformina). En general, concluimos que inhibir el metabolismo de HSC es una estrategia novedosa y relevante para suprimir la fibrogénesis hepática.

Se sabe que los flujos de calcio intracelulares controlan la activación, la migración y la proliferación de HSC y que el receptor de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP_3R) es un transportador que exporta calcio fuera del retículo endoplásmico (ER). En el **Capítulo 3**, investigamos el papel de un nuevo inhibidor de IP_3R , desmetil Xestospongina B (dmXeB), para modular la activación de HSC. Para esto, utilizamos cultivos primarios de qHSC y aHSC de rata y analizamos los niveles de mRNA y proteína de los marcadores de activación (α SMA, Colágeno-I), proliferación, migración y metabolismo glucolítico y mitocondrial en ausencia o presencia de dmXeB. DmXeB suprimió la proliferación, la migración, los marcadores de activación y la respiración mitocondrial en aHSC. Además, dmXeB ayudó a mantener las características qHSC en cultivo. Es importante destacar que dmXeB no fue tóxico para los hepatocitos primarios de ratas ni para los organoides hepáticos humanos. Esto sugiere que dmXeB podría ser un posible candidato para el tratamiento de la fibrosis hepática.

Como se mencionó anteriormente, la ECM fibrótica se compone principalmente de colágenos y las HSC es la célula responsable de la producción y secreción de colágeno. La vitamina C (ácido ascórbico) es un cofactor de prolil-hidroxilasas que participan en la síntesis y secreción de colágenos, pero esto aún no se ha analizado en detalle para el aHSC humanas. Por lo tanto, en el **Capítulo 4** determinamos el efecto de la adición de ácido ascórbico y la inhibición de prolil-hidroxilasa en la producción y secreción de colágeno por HSC humanas. Las HSC humanas se aislaron de tejido hepático sano y fueron activadas en cultivo. Las células HSC humanas y la línea celular de HSC humana LX-2 se trataron con ácido ascórbico, factor de

crecimiento transformante beta ($TGF\beta$) y/o el inhibidor de hidroxilasa dimetiloxalilglicina (DMOG). El ácido ascórbico en co-tratamiento con $TGF\beta$ promovió fuertemente la liberación de colágeno-I, causando una fuerte reducción en los niveles intracelulares de proteína de colágeno-I y aumentando la liberación de hidroxiprolina al medio extracelular. DMOG inhibió la liberación de colágeno-I incluso en presencia de ácido ascórbico y redujo la expresión (mRNA) de colágeno-I y α SMA, incluso en condiciones de hipoxia. Además, HSC humanas expresan solo uno de los dos transportadores de ácido ascórbico y este aumenta selectivamente en hígado cirrótico. En general, concluimos que las HSC humanas necesitan ácido ascórbico para la secreción eficiente de colágeno I, y esta puede ser bloqueada de manera efectiva por antagonistas de hidroxilasa, revelando nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la fibrosis hepática.

La maquinaria molecular que impulsa la liberación de colágeno-I desde el ER al espacio extracelular no ha sido completamente descrita, y en el **Capítulo 5** evaluamos el papel de las ATPasas tipo P de clase 4 (P4-ATPasas), que regulan la asimetría de lípidos en las membranas biológicas y controlan la secreción de proteínas mediada por vesículas. Aquí, analizamos el papel de CDC50A (un heterodímero esencial de la mayoría de las P4-ATPasas) y varias P4-ATPasas en el control de la secreción de colágeno-I por las HSC humanas. Para inhibir la expresión de CDC50A y ATP10D se hizo una transducción lentiviral con shRNA y CRISPR/Cas9 en células LX-2. La reducción de CDC50A y ATP10D en células LX-2 causó una clara acumulación intracelular de colágeno-I y redujo la deposición extracelular de esta proteína. Nuestros resultados demuestran que ATP10D y su compañero accesorio CDC50A son necesarios para la secreción eficiente de colágeno-I por las HSC humanas y, por lo tanto, juegan un papel en el desarrollo de la fibrosis hepática.

En resumen, en esta tesis describimos las vías metabólicas clave en HSC y los mecanismos moleculares que impulsan la producción y liberación de colágeno-I por HSC *in vitro*, identificando nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la fibrosis hepática.



